

单一内标定量核磁法测定肺炎链球菌多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量

郭吉茹¹, 秦春君¹, 胡静², 曹欣³, 徐永学³, 刘建凯³, 尹健^{1,4*}

(¹ 江南大学生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; ² 江南大学无锡医学院, 无锡 214122;

³ 北京民海生物科技有限公司 结合疫苗新技术研究北京市重点实验室, 北京 102600;

⁴ 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122)

摘要 肺炎糖疫苗在预防由肺炎链球菌引起的肺炎和脑膜炎等疾病中发挥关键作用。荚膜多糖、C-多糖和磷含量是疫苗研发和生产中多糖抗原质量控制的重要指标, 研究发展了基于单一内标物六甲基磷酰三胺 (hexamethylphosphoramide, HMPA) 的定量¹H NMR 和³¹P NMR 法, 实现 6A, 6B, 18C, 19A, 19F 及 23F 型肺炎链球菌多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量的同步测定。利用内参物比较法, 探究了多糖溶解性质对定量核磁测定的影响, 发现定量¹H NMR 的测定结果受到多糖水溶液黏度和浓度的影响。发现高黏度多糖在 3~15 mg/mL, 低黏度多糖在 5~25 mg/mL 是最适检测液浓度范围。该“一内标三定量”NMR 法具有良好的精密度、特异性和准确度, 为肺炎链球菌疫苗的质量控制提供了一种有价值的新策略。

关键词 肺炎链球菌; 荚膜多糖; 定量¹H NMR; 定量³¹P NMR; C-多糖; 磷

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)04-0472-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024020502

引用本文 郭吉茹, 秦春君, 胡静, 等. 单一内标定量核磁法测定肺炎链球菌多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(4): 472–477.

Cite this article as: GUO Jiru, QIN Chunjun, HU Jing, et al. Quantitative determination of capsular polysaccharide, C-polysaccharide, phosphorus of carbohydrate antigens from *Streptococcus pneumoniae* by quantitative NMR using a single internal standard[J]. J China Pharm Univ, 2024, 55(4): 472–477.

Quantitative determination of capsular polysaccharide, C-polysaccharide, phosphorus of carbohydrate antigens from *Streptococcus pneumoniae* by quantitative NMR using a single internal standard

GUO Jiru¹, QIN Chunjun¹, HU Jing², CAO Xin³, XU Yongxue³, LIU Jiankai³, YIN Jian^{1,4*}

¹Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Ministry of Education), School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122; ³Beijing Key Laboratory of New Technology Research of Conjugate Vaccine, Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102600; ⁴School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Pneumococcal vaccine plays a key role in preventing diseases such as pneumonia and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Capsular polysaccharide, C-polysaccharide and phosphorus content are important indicators for quality control of polysaccharide antigens in vaccine development and production. In this study, a quantitative ¹H NMR and ³¹P NMR method based on a single internal standard hexamethylphosphoramide (HMPA) was developed to achieve simultaneous determination of capsular polysaccharide, C-polysaccharide and phosphorus content in 6A, 6B, 18C, 19A, 19F and 23F *S. pneumoniae* polysaccharide antigens. Using the internal reference comparison method, the effect of solubility of

收稿日期 2024-02-05 * 通信作者 Tel: 0510-85328229 E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.22325803, No.22277042, No.22077052, No.22177041)

polysaccharide on quantitative ^1H NMR determination was investigated. It was found that the determination results of quantitative ^1H NMR were affected by the viscosity and concentration of polysaccharide solution. It was found that high viscosity polysaccharides at 3–15 mg/mL and low viscosity polysaccharides at 5–25 mg/mL were the optimal detection solution concentration range. This “one internal standard three quantitative” NMR method has good precision, specificity and accuracy, and provides a valuable new strategy for the quality control of pneumococcal vaccine.

Key words *Streptococcus pneumoniae*; capsular polysaccharide; quantitative ^1H NMR; quantitative ^{31}P NMR; C-polysaccharide; phosphorus

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22325803, No. 22277042, No. 22077052, No. 22177041)

肺炎链球菌性疾病由于其发病率和病死率高, 是全球重大公共卫生问题之一^[1–2]。世界卫生组织将肺炎链球菌疾病列为“极高度优先”需要接种疫苗预防的两种疾病之一^[3]。根据细胞表面荚膜多糖结构, 肺炎链球菌可分为 101 种血清型菌株^[4], 其中 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 和 33F 这 24 种血清型涵盖引起婴幼儿重症肺炎 90% 以上临床病例。已上市的肺炎链球菌疫苗均采用荚膜多糖作为抗原。据此, 第 1 代肺炎多糖疫苗发展至 23 价产品, 而适用于婴幼儿的第 2 代肺炎多糖结合疫苗则以 13 价肺炎多糖结合疫苗为代表性产品。

肺炎链球菌荚膜多糖的重复单元通常由 2~7 个单糖组成, 可分为含脱氧糖类多糖、含乙酰氨基糖类多糖和其他多糖 3 类^[5]。肺炎链球菌糖疫苗的免疫保护作用受荚膜多糖的纯度、相对分子质量分布、与蛋白结合率等因素影响^[6–7], 给多价肺炎糖疫苗的质量控制带来了很大挑战。C-多糖作为细菌细胞壁的组成成分, 是肺炎链球菌表面普遍存在的一种糖类物质, 也是荚膜多糖提取物中的常见杂质^[8]。C-多糖的结构由含有磷酸胆碱取代基的磷酸二酯连接的线性五糖重复单元组成^[9]。当制备肺炎多糖结合疫苗时, 残留的 C-多糖会使人体产生抗 C-多糖的抗体, 这些抗体不能抵抗肺炎链球菌的感染, 影响对多糖结合疫苗免疫应答的评估^[10–11]。综上, 荚膜多糖的品质控制需开展多个理化指标的检定, 尤其是荚膜多糖含量、C-多糖含量, 针对含磷酸酯基多糖则还需开展磷含量的测定。

随着核磁共振技术的普及和仪器性能的升级^[12], 越来越多的研究采用定量核磁共振谱图 (qNMR) 来实现质量控制^[13]。Xu 等^[14]以二甲基亚砜为内标物, 建立了一种测定 6B, 10A, 17F, 19A, 19F

及 20 型肺炎链球菌荚膜多糖含量的定量 ^1H NMR 法。Pu 等^[15]以六甲基磷酰三胺 (hexamethylphosphoramide, HMPA) 为内标物, 利用定量 ^{31}P NMR 法测定 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖中磷含量。本课题组发展了一种利用单一内标同步测定 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖中多糖和磷含量的 qNMR 法^[16]。

本团队长期致力于细菌糖疫苗的研究与开发^[17–21], 以及质量控制技术的开发^[22–26]。本研究针对含有磷酸二酯键的 6A, 6B, 18C, 19A, 19F 及 23F 型肺炎链球菌荚膜多糖, 进一步发展一种用于高效测定肺炎多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量的 qNMR 法。针对现有 qNMR 法依赖不同内标物测定多糖中各种组分的现状, 以 HMPA 作为定量 ^1H NMR 和 ^{31}P NMR 法内标物, 并探究了多糖溶解度、浓度对检测结果的影响, 旨在提高肺炎糖疫苗质量控制的准确度和效率。

1 材料

研究所用 6A、6B、18C、19A、19F、23F 型肺炎链球菌荚膜多糖由北京民海生物科技有限公司提供。所用试剂为 HMPA (纯度 99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 重水 (氘代度 99.9%)、N-乙酰-D-半乳糖胺 (纯度 98%) (北京伊诺凯科技有限公司), 其他试剂均为市售分析纯。

所用仪器为 Ultrashield Plus 400 MHz 核磁共振波谱分析仪 (德国布鲁克公司); EX125DZH 型电子天平 (上海奥豪斯仪器有限公司)。

2 方法

2.1 多糖母液的配制

称取一定量的肺炎链球菌荚膜多糖冻干物, 溶解于重水中, 震荡混匀后配制 20 mg/mL 的多糖

母液。

2.2 定量内标物母液的配制

精确称量 HMPA 28 mg, 用重水 10 mL 定容, 作为 2.8 mg/mL 内标物母液; 精确称量 HMPA 9 mg, 用重水 1 mL 定容, 作为 9 mg/mL 内标物母液。

2.3 定量内参物母液的配制

精确称量 *N*-乙酰-D-半乳糖胺 28 mg, 用重水 1 mL 定容, 作为 28 mg/mL 内参物母液。

2.4 含内参物的多糖检测液配制

参考 Xu 等^[20]的多糖检测液配制方法, 根据所需多糖、内标物、内参物的浓度, 分别量取 3 种母液, 以重水定容得到多糖检测液, 每种检测液平行配制 3 份。量多糖检测液取 0.5 mL 至核磁管中, 常温超声 3 min, 除去核磁管内溶液中的气泡, 3 个平行样品用于核磁检测。

2.5 纵向弛豫时间 T_1 的测定

核磁共振现象与原子核的受激跃迁和弛豫过程紧密相关。原子核吸收电磁波从低能级跃迁到较高能级, 弛豫过程使得处于高能级的原子核回到低能级。其中, 高能态的自旋核通过将其能量转移至周围其他分子的方式回到低能态的过程称为纵向弛豫。纵向弛豫过程所经历的时间为纵向弛豫时间(T_1)。使用核磁共振反转恢复(inversion recovery, IR)序列测定 T_1 , 利用双脉冲序列为 $\pi-\tau$ (变数) $-\pi/2-t_R$ 来观察 ^1H 核自由感应衰减(FID)信号。IR 得到原始数据的恢复时间(t)及其相应的幅度 $M(t)$, 利用单指数模型 $M(t)=M(0)(1-2e^{-t/T_1})$ 拟合曲线 $t-M_0$ 可以得到 T_1 。

2.6 定量 ^1H NMR 法参数设置

参考 Xu 等^[9]和 Xu 等^[14]对肺炎链球菌荚膜多糖定量 ^1H NMR 法研究结果, 定量 ^1H NMR 法的仪器参数设置为采用 zg 30 脉冲序列, 脉冲角为 30° , 实验绝对温度控制为 298 K, 采样谱宽为 9000 Hz, 中心频率位于 δ_{H} 3.5, 采样点数为 64 K, 线宽因子为 0.3 Hz, 采样时间为 3.6 s, 空扫次数为 2 次, 采样次数为 64 次, 脉冲延迟时间设定为 30 s, 预扫描延迟设定为 6.5 μs 。每张谱图均经自动相位校正和自动基线校正处理, 以避免手动校正对定量结果的干扰。所有谱图的定量特征峰均采用同一积分区间, 确保信号被充分积分。

2.7 定量 ^{31}P NMR 法参数设置

参考 Pu 等^[15]对肺炎链球菌荚膜多糖定量

^{31}P NMR 法的研究结果, 定量 ^{31}P NMR 法的仪器参数设置为采用 zgpg30 脉冲序列, 脉冲角为 30° , 实验绝对温度控制为 298 K, 采样谱宽为 64100 Hz, 中心频率位于 8100 H_Z , 采样点数为 64 K, 线宽因子为 1 Hz, 采样时间为 0.5 s, 采样次数为 64 次, 空扫次数为 4 次, 脉冲延迟时间设定为 2 s, 预扫描延迟设定为 6.5 μs 。每张谱图均经自动相位校正和自动基线校正处理, 以避免手动校正对定量结果的干扰。所有谱图的定量特征峰均采用同一积分区间, 确保信号被充分积分。

2.8 计算公式

定量核磁测定中待测多糖与内标物的单位原子积分面积比值与其物质的量比值一致, 据此参考已报道的定量 ^1H NMR 和定量 ^{31}P NMR 的计算公式^[16], 利用定量核磁谱图中得到的各定量峰积分可得到多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量。

3 结果与讨论

3.1 定量 ^1H NMR 测定多糖和 C-多糖含量

3.1.1 内标物的优选 内标应有较高的纯度, 含有多个质子。HMPA 的理化性质稳定, 结构中 6 个甲基的特征峰位于 δ_{H} 2.58 和 δ_{H} 2.60, 与 6A, 6B, 18C, 19A, 19F 和 23F 型肺炎链球菌荚膜多糖的氢谱出峰完全分离, 且无其他杂峰干扰。

3.1.2 定量特征峰的优选 针对各型荚膜多糖 ^1H NMR 谱图, 开展了定量特征峰的优选。各血清型荚膜多糖 ^1H NMR 谱图中 δ_{H} 3.25 处都有 C-多糖磷酸胆碱的甲基氢特征定量峰信号。6A、6B、19A 及 19F 型荚膜多糖的定量峰选为 $\alpha\text{-L-Rhap}$ 的 6-甲基氢信号, 位于 δ_{H} 1.32; 23F 型荚膜多糖的定量峰选为 $\alpha\text{-L-Rhap}$ 与 $\beta\text{-L-Rhap}$ 的 6-甲基氢信号, 位于 δ_{H} 1.28。18C 型荚膜多糖由 5 种不同连接形式的单糖组成, 相对分子质量高达上百万, 溶解度较差, 影响结构中 $\alpha\text{-L-Rhap}$ 的 6-甲基氢信号效果。为了提升核磁谱图信号分辨率, 尝试向核磁检测液中加入 1% 氯化钠或 1% 磷酸盐, 但无明显效果。鉴于 18C 型荚膜多糖结构中氧乙酰化比例为 100%^[27], 其定量峰选择氧乙酰基甲基氢信号, 位于 δ_{H} 2.15。

3.1.3 弛豫延迟时间 D_1 的设定 对于 qNMR 技术, 30° 脉冲激发后必须有足够长的弛豫时间使所有被激发原子核恢复到平衡态, 保证谱图上每个峰

的积分面积与质子数成正比, D1 设定一般为 T1 的 5~7 倍。D1 的设定应以 T1 大的组分为依据进行设定, 通过反转恢复实验对所有质子定量峰共振谱线的 T1 分别进行测试, HMPA 定量峰的 T1 为 3.433 s。C-多糖定量峰的 T1 为 0.436 s, 6A、6B、18C、19A、19F、23F 型肺炎链球菌荚膜多糖定量峰的 T1 分别为 0.855、0.849、2.488、0.798、0.706 和 1.310 s。最大纵向弛豫时间为 3.433 s, 因此设定 D1 为 30 s。

3.1.4 多糖溶液黏度对定量¹H NMR 的影响 ¹H NMR 的采集效果受到样品溶液黏度的影响, 通常多糖浓度提高, 相应的黏度增加, 不利于¹H NMR 的采集, 容易导致峰的宽化, 因此多糖浓度不宜过高。不同多糖的黏度有差异, 按照在 20 mg/mL 质量浓度下多糖溶液呈黏稠糖浆状或流动液体状, 将多糖按黏度定性分为高黏度多糖(18C 型肺炎链球菌荚膜多糖)与低黏度多糖(6A、6B、19A、19F、23F 型肺炎链球菌荚膜多糖)。为了进一步明确黏度对于多糖的 qNMR 准确性的影响, 采用一种多糖结构中不含有的单糖作为参考物质。

针对高低两种黏度的多糖, 以 5 mg/mL 6A 型和 18C 型肺炎链球菌荚膜多糖溶液为例, 选择多糖结构中不含有的 *N*-乙酰-D-半乳糖胺作为参考物质, 明确多糖溶液黏度对内参物定量结果的影响。6A 型肺炎链球菌荚膜多糖在 5 mg/mL 检测浓度下, 定量¹H NMR 所测得的 *N*-乙酰-D-半乳糖胺含量与实际纯度差小于 0.3%, RSD($n=3$)为 0.93%, 回收率为 100.31%。18C 型肺炎链球菌荚膜多糖在 5 mg/mL 检测浓度下, 定量¹H NMR 所测得的 *N*-乙酰-D-半乳糖胺含量与实际纯度差小于 1.18%, RSD($n=3$)为 1.19%, 回收率为 101.20%。上述结果表明, 在高黏度和低黏度多糖溶液中, 开展内参物 *N*-乙酰-D-半乳糖胺含量检测均具有良好的精密度。

3.1.5 多糖溶液浓度对定量¹H NMR 的影响 已报道的定量¹H NMR 检测肺炎链球菌多糖含量的方法中, 对于核磁参数设置开展了系统的研究^[28], 为 qNMR 方法的发展和应用提供了重要参考。然而, 肺炎链球菌多糖检测液浓度对于 qNMR 法检测结果的影响尚无已报道的研究工作。值得注意的是, 相较于小分子物质, 相对分子质量达到 600 kD 的肺炎链球菌荚膜多糖溶解于重水中, 配制为常规 NMR 测试浓度溶液时具有一定的黏度, 且随着浓

度提高而不断增加。高黏度多糖, 如 18C 型肺炎链球菌荚膜多糖, 20 mg/mL 质量浓度的溶液呈黏稠糖浆状, 而低黏度多糖, 如 6A 型肺炎链球菌荚膜多糖, 60 mg/mL 溶液仍呈流动液体状。检测液黏度的提高不仅增加了核磁样品配制的操作难度, 还将降低 NMR 谱图的分辨率, 导致 qNMR 谱图中各个信号的积分存在较大误差。另一方面, 核磁信号的强度及其准确度也与检测液中样品的浓度相关, 浓度过低不利于核磁谱图采集的效果和经济性, 将显著降低 qNMR 法的准确性和实用性。对于具有极大相对分子质量的肺炎链球菌荚膜多糖, 其检测液浓度不宜过低, 以便获得理想的 NMR 检测结果。基于以上考虑, 以 HMPA 作为内标物质时, 对于肺炎链球菌荚膜多糖检测液浓度对定量¹H NMR 的影响开展了探究, 兼顾检测液的浓度、黏度与核磁信号强度、分辨率的相关性, 高黏度肺炎链球菌荚膜多糖检测液质量浓度可在 3, 6, 9, 12 和 15 mg/mL 之间开展考察; 低黏度肺炎链球菌荚膜多糖检测液质量浓度可在 5, 10, 15, 20 和 25 mg/mL 之间开展考察。所有的实验均开展了 3 次平行实验。

对于高黏度的 18C 型肺炎链球菌荚膜多糖, 在 3, 6, 9, 12, 15 mg/mL 质量浓度下, 定量¹H NMR 测得多糖含量(以重复单元相对分子质量 989.79 计)的 RSD($n=3$)均小于 5%, 其中检测液质量浓度 15 mg/mL 时测定值的 RSD 最小(1.2%)。对 18C 型荚膜多糖的不同检测浓度下所得多糖含量进行显著性分析, 发现在 3, 6, 9, 12, 15 mg/mL 质量浓度下进行定量¹H NMR 检测时, 所测得多糖含量之间均无显著性差异($P>0.05$)(图 1)。

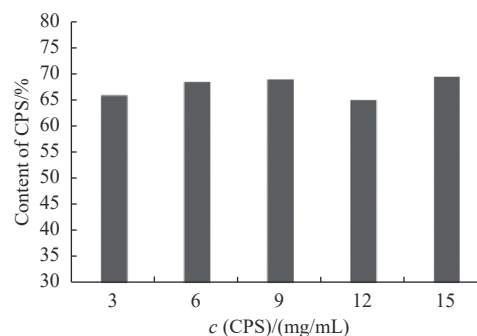


Figure 1 Effect of polysaccharide concentration on ¹H NMR quantitative determination of CPS from *S. pneumoniae* serotype 18C ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

对于低黏度的 6A 型肺炎链球菌荚膜多糖, 在 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL 质量浓度下, 定量¹H NMR

测得荚膜多糖含量(以重复单元相对分子质量 683.53 计)的 RSD($n=3$)均小于 1.2%, 其中检测液质量浓度 10 mg/mL 时测定值的 RSD 最小(0.24%)。对 6A 型荚膜多糖的不同检测浓度下所得多糖含量进行显著性分析, 发现在 5~25 mg/mL 质量浓度下进行定量 ^1H NMR 检测时, 所测的多糖含量之间均无显著性差异($P>0.05$)(图 2)。

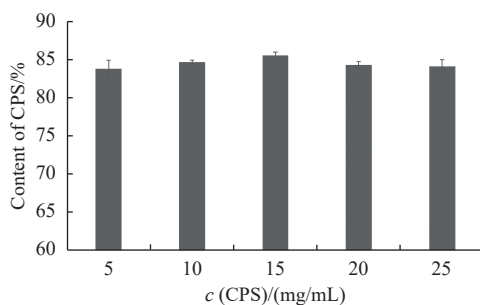


Figure 2 Effect of polysaccharide concentration on ^1H NMR quantitative determination of CPS from *S. pneumoniae* serotype 6A. ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.1.6 肺炎链球菌多糖抗原中荚膜多糖和 C-多糖含量的测定 按照上述优化的检测浓度完成了各型多糖的检测, 开展了 3 次平行实验。经计算后得到 6A、6B、18C、19A、19F、23F 血清型肺炎链球菌多糖抗原中的荚膜多糖含量分别为(83.037±0.196)%, (79.935±0.709)%, (68.439±1.380)%, (84.290±0.730)%, (77.176±1.409)%, (75.900±0.231)%。6A、6B、18C、19A、19F、23F 血清型肺炎链球菌多糖抗原中的 C-多糖含量分别为(1.467±0.021)%, (1.859±0.001)%, (1.934±0.023)%, (2.711±0.082)%, (2.125±0.071)%, (2.925±0.121)%。

3.2 定量 ^{31}P NMR 法测定磷含量

3.2.1 定量特征峰的选择 各型肺炎链球菌荚膜多糖定量 ^{31}P NMR 的定量峰的化学位移为-0.02, 固定积分范围为 0.32 ~ -0.35。

3.2.2 内标物的选择 内标物定量峰需与所测样品的定量峰分离良好, 不产生干扰。内标物 HMPA 和肺炎链球菌荚膜多糖的定量 ^{31}P NMR 谱图中两组峰完全分离, 互不干扰。因此选用 HMPA 作为定量 ^{31}P NMR 的内标物。

3.2.3 肺炎链球菌多糖抗原中磷含量的测定 开展了 3 次平行实验后计算得到 6A、6B、18C、19A、19F、23F 血清型肺炎链球菌多糖抗原中磷含量分别为(3.941±0.006)%, (3.877±0.077)%, (2.878

±0.119)%, (3.943±0.047)%, (4.255±0.032)% 和 (3.216±0.090)%。

4 结论

肺炎链球菌荚膜多糖的质量控制体系是多糖疫苗和多糖结合疫苗安全、有效的保障。目前, 肺炎链球菌多糖抗原的质量控制主要有免疫学、化学法和仪器检测法, 其中 qNMR 法可确定肺炎链球菌荚膜多糖结构, 测定多糖含量和磷含量, 也可定量分析 C-多糖这类残留物质。本研究采用 qNMR 法开展肺炎链球菌多糖抗原组分定量研究, 定量峰的选择是至关重要的部分。针对 6A、6B、19A、19F、23F 型多糖, 鉴于其都有一个位于 δ_{H} 1.30 左右的孤立峰, 统一选择 Rhap 的 6-甲基氢信号作为定量特征峰。而 18C 型荚膜多糖由于溶解度较差, 影响结构中 Rhap 的 6-甲基氢信号效果。鉴于其为完全氧乙酰化, 定量特征峰选择氧乙酰基的甲基氢信号。以 HMPA 为单一内标物, 实现了 6A、6B、18C、19A、19F、23F 型肺炎链球菌多糖抗原中荚膜多糖、C-多糖和磷含量的同步测定。进一步优化了核磁参数, 利用内参物的定量分析验证了 qNMR 检测的准确性。同时, 探究了多糖黏度、多糖检测液质量浓度对 qNMR 检测准确性的影响, 发现高黏度多糖(18C 型荚膜多糖)最适检测的质量浓度范围为 3~15 mg/mL, 低黏度多糖(6A、6B、19A、19F、23F 型荚膜多糖)最适检测的质量浓度范围为 5~25 mg/mL。

qNMR 具有可靠、精确、准确、应用范围广等优点, 具有广泛的应用前景, 能有效提高疫苗生产中肺炎链球菌荚膜多糖品质控制的工作效率。本研究中发展的“一内标三定量”qNMR 法为肺炎链球菌糖疫苗的质量控制和升级换代提供了重要的技术保障, 并将为其他生物医药制品的品质控制提供参考。

References

- [1] Zhou ZR, Xie HT, Ma BN, et al. Review of *Streptococcus pneumoniae* carbohydrate-based vaccines[J]. *Pharm Biotechnol*(药物生物技术), 2022, 8(2): 177-181.
- [2] Wang SJ, Wang ZF. Recent advances in the development of *Streptococcus pneumoniae* vaccines[J]. *Progress*(进展), 2023 (17): 162-164.
- [3] WHO. Meeting of the Immunization strategic advisory group of experts, November 2007: conclusions and recommendations[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2008, 83(1): 1-15.

- [4] Silva PH, Vázquez Y, Campusano C, *et al.* Non-capsular based immunization approaches to prevent *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, **12**: 949469.
- [5] Su T, Nakamoto R, Chun YY, *et al.* Decoding capsule synthesis in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2021, **45**(4): fuaa067.
- [6] Tian Y, Ma K, Su XY. Progress in research on multivalent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-protein conjugate vaccine[J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2022, **35**(10): 1268-1273.
- [7] Zhang F, Cao F, Chen YR, *et al.* Application of one dimensional nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum in quality control of pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine[J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2022, **35**(10): 1237-1241,1248.
- [8] Talaga P, Bellamy L, Moreau M. Quantitative determination of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *Vaccine*, 2001, **19**(20/21/22): 2987-2994.
- [9] Xu QW, Abeygunawardana C, Ng AS, *et al.* Characterization and quantification of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide preparations[J]. *Anal Biochem*, 2005, **336**(2): 262-272.
- [10] Wu YY, Li XX, Shen R, *et al.* Development a method in detection content for *Streptococcus pneumoniae* C polysaccharide[J]. *Prog Microbiol Immunol* (微生物学免疫学进展), 2019, **47**(2): 22-28.
- [11] Rohrer JS. Vaccine quality ensured by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. *SLAS Technol*, 2020, **25**(4): 320-328.
- [12] Luan JQ, Jia W, Hua ZD, *et al.* Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the screening of new psychoactive substances[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, **49**(5): 545-552.
- [13] Jiang MH, Yu XB, Mao LS, *et al.* Quantitative determination of 10-O-(N, N-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate by nuclear magnetic resonance[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2013, **44**(4): 339-342.
- [14] Xu MF, Chen Q, Li MG, *et al.* Determination of capsular polysaccharide contents of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6B, 10A, 17F, 19A, 19F and 20 by quantitative ¹H-NMR method[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2020, **29**(21): 2481-2485.
- [15] Pu YQ, Zhu WY, Wu YN, *et al.* Determination of the phosphorus content of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharides through nuclear magnetic resonance(³¹P-NMR) compared with traditional method[J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2018, **29**(6): 825-830.
- [16] Qin CJ, Hu J, Tong W, *et al.* Determination of ribose and phosphorus contents in *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide by a quantitative NMR method using a single internal standard[J]. *Chin J Nat Med*, 2022, **20**(8): 633-640.
- [17] Qin CJ, Schumann B, Zou XP, *et al.* Total synthesis of a densely functionalized *Plesiomonas shigelloides* serotype 51 aminoglycoside trisaccharide antigen[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(8): 3120-3127.
- [18] Qin CJ, Li LX, Tian GZ, *et al.* Chemical synthesis and antigenicity evaluation of *Shigella dysenteriae* serotype 10 O-antigen tetrasaccharide containing a (S)-4, 6-O-pyruvyl ketal[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(46): 21068-21079.
- [19] Zou XP, Hu J, Zhao M, *et al.* Chemical synthesis of the highly sterically hindered core undecasaccharide of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide for antigenicity evaluation with human serum[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(32): 14535-14547.
- [20] Tian GZ, Hu J, Qin CJ, *et al.* Chemical synthesis and immunological evaluation of *Helicobacter pylori* serotype O6 tridecasaccharide O-antigen containing a dd-heptoglycan[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(32): 13362-13370.
- [21] Zhou XY, Li LX, Zhang Z, *et al.* Chemical synthesis and antigenic evaluation of inner core oligosaccharides from *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(29): e202204420.
- [22] Qi QH, Huang CH, Zheng XX, *et al.* Determination of ethanol and acetone residues in purified polysaccharides of type 6B *Streptococcus pneumoniae* by headspace gas chromatography[J]. *China Med Her*(中国医药导报), 2023, **20**(18): 10-14.
- [23] Chen Q, Wang SS, Lv XY, *et al.* Preparation of national reference for serotype 19A pneumococcal polysaccharide[J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2022, **35**(4): 433-436.
- [24] Wang YY, Cao X, Lin HQ, *et al.* Screening of solid culture medium without animal-derived materials for resuscitation of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 2023, **36**(10): 1172-1178.
- [25] Cao X, Xu YX, Liu YL, *et al.* Establishment and optimization of purification process for type 5 pneumococcal capsular polysaccharide[J]. *Int J Biol*(国际生物制品学杂志), 2022, **45**(4): 200-204.
- [26] Su X, Li S, Ti J, *et al.* Impact of molecular size of type 8 pneumococcal capsular polysaccharide on binding efficiency and antigenicity of conjugates[J]. *Int J Biol*(国际生物制品学杂志), 2023, **46**(4): 186-191.
- [27] Alain PP, Anaïs FV, Lauro NP, *et al.* Caracterización del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C mediante la combinacion de metodos cromatograficos y RMN¹H[J]. *Rev CENIC, Cienc quim*, 2013, **44**(1): 57-67.
- [28] Du J, Zhou HF, Li XL, *et al.* Development and validation of a nuclear magnetic resonance method for determination of pyruvic acid in pneumococcal serotype 4 polysaccharide[J]. *Prog Microbiol Immunol* (微生物学免疫学进展), 2023, **51**(2): 18-24.